

09/554386

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	07 JAN. 1999
WIPO	PCT

## Bescheinigung

Die Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien in Düsseldorf/  
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verwendung von ausgewählten Phytostenolestern  
zur Herstellung von hypocholesterinämischen  
Mitteln"

am 14. November 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-  
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-  
bole C 07 J und A 61 K der Internationalen Patentklassifika-  
tion erhalten.

München, den 7. Juli 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts  
Im Auftrag

Schulenburg

Aktenzeichen: 197 50 422.1

M 05. 11. 97

Henkel KGaA  
TTP-Patente/FB/691/91/PSE/CCH

Patentanmeldung  
H 3190

## Verwendung von ausgewählten Phytostenolestern zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln

11. November 1997

### Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Phytostenolestern, gegebenenfalls zusammen mit ausgewählten Potenzierungsmitteln zur Herstellung von Mitteln zur Verminderung des Cholesteringehaltes im Serum von Warmblütern.

### Stand der Technik

Unter hypocholesterinämischen Wirkstoffen werden Mittel verstanden, die zu einer Verminderung des Cholesteringehaltes im Serum von Warmblütern führen, ohne daß dadurch eine Hemmung oder Verringerung der Bildung von Cholesterin im Blut eintritt. Für diesen Zweck wurden bereits von Peterson et al. in *J.Nutrit.* **50, 191 (1953)** Phytostenole, also pflanzliche Stenole, und deren Ester mit Fettsäuren vorgeschlagen. In die gleiche Richtung weisen auch die Patentschriften **US 3,089,939**, **US 3,203,862** sowie die deutsche Offenlegungsschrift **DE-OS 2035069** (Procter & Gamble). Die Wirkstoffe werden üblicherweise Brat- oder Speiseölen zugesetzt und dann über die Nahrung aufgenommen, wobei die Einsatzmengen jedoch in der Regel gering sind und üblicherweise unter 0,5 Gew.-% liegen, um zu verhindern, daß die Speiseöle eintrüben oder die Stenole bei Zusatz von Wasser ausgefällt werden. Für den Einsatz im Nahrungsmittelbereich, in Kosmetika, pharmazeutischen Zubereitungen und im Agrarsektor werden in der europäischen Patentanmeldung **EP-A1 0289636** (Ashai) lagerstabile Emulsionen der Stenolester in Zucker- oder Polyglycerinestern vorgeschlagen. Die Einarbeitung von Sitostenolestern zur Verminderung des Blutcholesteringehaltes in Margarine, Butter, Mayonnaise, Salatsaucen und dergleichen wird in der Europäischen Patentschrift **EP-B1 0594612** (Raision) vorgeschlagen.

Von Nachteil ist jedoch, daß die Phytostenolester den Nahrungsmitteln üblicherweise nur in geringen Mengen zugesetzt werden können, da ansonsten die Gefahr besteht, daß sie den Geschmack und/oder die Konsistenz der Mittel beeinträchtigen. Zur nachhaltigen Beeinflussung des Cholesterin-

gehalten im Blut wäre jedoch die Aufnahme größerer Mengen Phytostenolester wünschenswert. Weiterhin verbesserungswürdig ist die Geschwindigkeit, mit der die Stoffe den Gehalt an Cholesterin im Serum vermindern. Die Aufgabe der Erfindung hat folglich darin bestanden, diesen Mängeln abzuhelpfen.

### **Beschreibung der Erfindung**

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Estern von Phytostenolen mit Fettsäuren mit 6 bis 24 Kohlenstoffatomen und mindestens 2 konjugierten Doppelbindungen, gegebenenfalls zusammen mit Potenzierungsmitteln ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird von Tocopherolen, Chitosanen, Phytostenolsulfaten und/oder (Desoxy)Ribonucleinsäuren, zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß Phytostenolester auf Basis konjugierter Fettsäuren bei der Senkung des Cholesteringehaltes im Blut eine deutlich höhere Aktivität zeigen als vergleichbare Phytostenolester, die sich von gesättigten Fettsäuren, einfach ungesättigten Fettsäuren oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit zwei und mehr, nicht-konjugierten Doppelbindungen ableiten. Durch Kombination der erfindungsgemäß zu verwendenden Phytostenolester (Komponente a) mit Potenzierungsmitteln (Komponente b) aus der Gruppe der Chitosane, Phytostenolsulfate und/oder Desoxy- bzw. Ribonucleinsäuren, die selbst über keine oder nur sehr geringe hypocholesterinämischen Eigenschaften verfügen, kann die Abnahme des Cholesteringehaltes im Serum weiter beschleunigt werden. In Gelatine verkapselt lassen sich sowohl die Phytostenolester als auch die Wirkstoffgemische zudem problemlos oral einnehmen.

### **Phytostenolester**

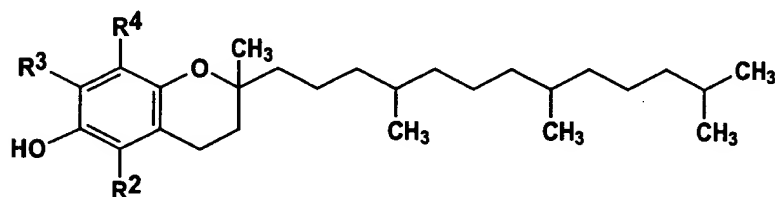
Unter Phytostenolen (oder synonym Phytosterolen) sind pflanzliche Steroide zu verstehen, die nur am C-3 eine Hydroxylgruppe, sonst aber keine funktionellen Gruppen tragen. In der Regel besitzen die Phytostenole 27 bis 30 Kohlenstoffatome und eine Doppelbindung in 5/6, gegebenenfalls 7/8, 8/9 oder anderen Positionen. Durch Härtung können aus den ungesättigten Stenolen die entsprechenden gesättigten Stanole erhalten werden, die von der Erfindung mitumfaßt werden. Durch Veresterung der Stenole bzw. Stanole mit ungesättigten Fettsäuren mit konjugierten Doppelbindungen, vorzugsweise konjugierter Linolsäure (CLA) oder konjugierten Fischfettsäuren, werden die Stoffe erhalten, die die Komponente (a) bilden. Die Phytostenolkomponente der Ester kann sich dabei von Ergostenolen, Campestenolen, Stigmastenolen, Brassicastenolen sowie vorzugsweise Sitostenolen bzw. Sitostanolen und insbesondere  $\beta$ -Sitostenolen bzw.  $\beta$ -Sitostanolen ableiten. Die Herstellung kann in an sich bekannter

11.05.1995

Weise erfolgen, beispielsweise durch direkte Veresterung der Stenole mit den Fettsäuren und anschließender Härtung der Ester, durch direkte Veresterung der Stanole mit den Fettsäuren oder vorzugsweise durch Umesterung und gegebenenfalls Härtung der Stenole bzw. Stanole mit den entsprechenden Konjuefetsäuremethylestern. Ein allgemeines Herstellverfahren durch Umesterung der Stenole/Stanole mit Fettsäureniedrigalkylestern oder Triglyceriden in Gegenwart geeigneter Katalysatoren, wie z.B. Natriummethylat oder speziell auch Enzymen wird in der **EP-A2 0195311** (Yoshikawa) beschrieben. Im Sinne der Erfindung kann die Fettsäurekomponente der Phytostenolester auch in untergeordneten Mengen (kleiner 50 Mol-%) gesättigte, einfach ungesättigte oder mehrfach ungesättigte, nicht-konjugierte Anteile enthalten. Demzufolge kann beispielsweise zur Herstellung der Ester anstelle reiner konjugierter Linolsäure auch eine technische Mischung mit einem hohen Anteil an konjugierter Linolsäure eingesetzt werden, wie sie beispielsweise unter der Bezeichnung Selin® CLA (Grünau) im Handel erhältlich ist. In gleicher Weise können zur Herstellung der Phytostenolester auch entsprechende Fettsäuremethylester oder Triglyceride (z.B. Selin® CLA-TG) mit hohem Konjuegehalt umgeestert werden.

### Tocopherole

Unter Tocopherolen, die als Potenzierungsmittel für die Phytostenolester in Frage kommen, werden in 2-Stellung mit 4,8,12-Trimethyltridecyl-Resten substituierte Chroman-6-ole (3,4-Dihydro-2-*H*-1-benzopyran-6-ole) verstanden, die der Formel (II) folgen,



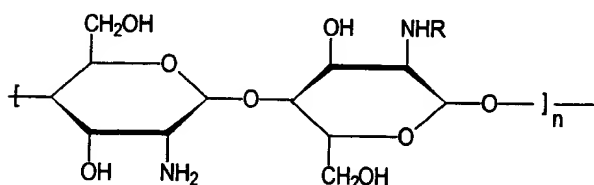
(II)

in der R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Methylgruppe stehen. Tocopherole zählen zu den Biochinonen, also polyprenylierten 1,4-Benzo- bzw. Naphthochinonen, deren Prenylketten mehr oder weniger stark gesättigt sind. Typische Beispiele für Tocopherole, die im Sinne der Erfindung als Komponente (b1) in Betracht kommen, sind Ubichinone, Bovichinone, K-Vitamine und/oder Menachinone (2-Methyl-1,4-Naphthochinone). Man unterscheidet bei den Tocopherolen weiterhin  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Tocopherole, wobei letztere noch über die ursprüngliche ungesättigte Prenylseitenkette verfügen, sowie  $\alpha$ -Tocopherolchinon und -hydrochinon, bei denen das Pyran-Ringsystem geöffnet ist. Vorzugsweise wird als Komponente (b)  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) der Formel (II) eingesetzt, bei der R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> für Methylgruppen stehen, oder Ester des  $\alpha$ -Tocopherols mit Carbon-

säuren mit 2 bis 22 Kohlenstoffatomen, wie beispielsweise  $\alpha$ -Tocopherolacetat oder  $\alpha$ -Tocopherolpalmitat.

### Chitosane

Chitosane, die ebenfalls als Potenzierungsmittel (b2) für die Phytostenolester in Frage kommen, stellen Biopolymere dar und werden zur Gruppe der Hydrokolloide gezählt. Chemisch betrachtet handelt es sich um partiell deacetylierte Chitine unterschiedlichen Molekulargewichtes, die den folgenden - idealisierten - Monomerbaustein (III) enthalten:



(III)

Im Gegensatz zu den meisten Hydrokolloiden, die im Bereich biologischer pH-Werte negativ geladen sind, stellen Chitosane unter diesen Bedingungen kationische Biopolymere dar. Die positiv geladenen Chitosane können mit entgegengesetzt geladenen Oberflächen in Wechselwirkung treten und werden daher in kosmetischen Haar- und Körperpflegemitteln sowie pharmazeutischen Zubereitungen eingesetzt (vgl. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 5th Ed., Vol. A6, Weinheim, Verlag Chemie, 1986, S. 231-332). Übersichten zu diesem Thema sind auch beispielsweise von B.Gesslein et al. in **HAPPI** 27, 57 (1990), O.Skaugrud in **Drug Cosm.Ind.** 148, 24 (1991) und E.Onsoyen et al. in **Seifen-Öle-Fette-Wachse** 117, 633 (1991) erschienen. Zur Herstellung der Chitosane geht man von Chitin, vorzugsweise den Schalenresten von Krustentieren aus, die als billige Rohstoffe in großen Mengen zur Verfügung stehen. Das Chitin wird dabei in einem Verfahren das erstmals von Hackmann et al. beschrieben worden ist, üblicherweise zunächst durch Zusatz von Basen deproteiniert, durch Zugabe von Mineralsäuren demineralisiert und schließlich durch Zugabe von starken Basen deacetyliert, wobei die Molekulargewichte über ein breites Spektrum verteilt sein können. Vorzugsweise werden entweder niedermolekulare Chitosane mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 50.000 bis etwa 250.000 Dalton oder hochmolekulare Chitosane mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 500.000 bis etwa 2.000.000 eingesetzt. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise aus **Makromol.Chem.** 177, 3589 (1976) oder der französischen Patentanmeldung **FR-A 2701266** bekannt. Besonders bevorzugt werden solche Typen eingesetzt, wie sie in den deutschen Patentanmeldungen **DE-A1 4442987** und **DE-A1 19537001** (Henkel) offenbart werden und die ein durchschnittliches Molekulargewicht von 800.000 bis 1.200.000 Dalton, eine Viskosität nach Brookfield (1 Gew.-%ig in Glycolsäure) unterhalb von 5000 mPas, einen Deacetylierungsgrad im Bereich von 80 bis 88 % und einem Aschegehalt von weniger als 0,3 Gew.-% aufweisen. Neben den Chitosanen als

NOV 11 1998

typischen kationischen Biopolymeren kommen im Sinne der Erfindung auch anionisch bzw. nichtionisch derivatisierte Chitosane, wie z.B. Carboxylierungs-, Succinylierungs- oder Alkoxylierungsprodukte in Frage, wie sie beispielsweise in der deutschen Patentschrift **DE-C2 3713099** (L'Oréal) sowie der deutschen Patentanmeldung **DE-A1 19604180** (Henkel) beschrieben werden.

### Phytostenolsulfate

Phytostenolsulfate, die ebenfalls als Potenzierungsmittel (b3) für die Phytostenolester in Frage kommen, stellen bekannte Stoffe dar, die beispielsweise durch Sulfatierung von Phytostenolen mit einem Komplex aus Schwefeltetroxid und Pyridin in Benzol hergestellt werden können [vgl. **J.Am.Chem.Soc. 63, 1259 (1941)**]. Typische Beispiele sind die Sulfate von Ergostenolen, Campestenolen, Stigmastenolen und Sitostenolen. Die Phytostenolsulfate können als Alkali- und/oder Erdalkalimetallsalze, als Ammonium-, Alkylammonium-, Alkanolammonium- und/oder Glucammoniumsalze vorliegen. In der Regel werden sie in Form ihrer Natriumsalze eingesetzt.

### (Desoxy)Ribonucleinsäuren

Unter (Desoxy)Ribonucleinsäuren (DNA bzw. RNA), die als letzte Gruppe von Potenzierungsmitteln (b4) für die Phytostenolester in Frage kommen, werden hochmolekulare, fadenförmige Polynucleotide verstanden, die sich von 2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribonucleosiden bzw. D-Ribonucleosiden ableiten, die ihrerseits wieder von äquivalenten Mengen einer Nucleobase und der Pentose 2-Desoxy-D-ribo-furanose bzw. D-Ribofuranose aufgebaut werden. Als Nucleobasen können die DNA bzw. RNA die Purinderivate Adenin und Guanin sowie die Pyrimidine Cytosin und Thymin bzw. Uracil enthalten. In den Nucleinsäuren sind die Nucleobasen N-glykosidisch mit Kohlenstoffatom 1 der Ribose, wodurch im Einzelfall Adenosine, Guanosine, Cytidine und Thimidine entstehen. In den Säuren verknüpft eine Phosphatgruppe die 5'-Hydroxygruppe der Nucleoside mit der 3'-OH-Gruppe der jeweils folgenden durch eine Phosphodiesterbrücke unter Ausbildung von Einzelstrang-DNA bzw. -RNA. Wegen des großen Verhältnisses von Länge zu Durchmesser neigen DNA- bzw. RNA-Moleküle schon bei mechanischer Beanspruchung, etwa bei der Extraktion, zu Strangbruch. Aus diesem Grunde kann das Molekulargewicht der Nucleinsäuren  $10^3$  bis  $10^9$  Dalton reichen. Im Sinne der Erfindung werden konzentrierte DNA bzw. RNA-Lösungen eingesetzt, die sich durch ein flüssigkristallines Verhalten auszeichnen. Vorzugsweise werden Desoxy- bzw. Ribonucleinsäuren eingesetzt, die aus marinen Quellen beispielsweise durch Extraktion von Fischsperma erhalten werden und die ein Molekulargewicht im Bereich von 40.000 bis 1.000.000 Dalton aufweisen.

M 05.11.99

**Gewerbliche Anwendbarkeit**

Die Wirkstoffmischungen der Erfindung können die Phytostenolester (a) und die Potenzierungsmittel (b) im Gewichtsverhältnis 99 : 1 bis 1 : 99, vorzugsweise 90 : 10 bis 10 : 90, insbesondere 70 : 25 bis 25 : 75 und besonders bevorzugt 60 : 40 bis 40 : 60 enthalten, wobei allein sicherzustellen ist, daß mit der erfindungsgemäßen Verwendung eine zur Senkung des Cholesteringehaltes im Blut ausreichende Menge der Komponente (a) aufgenommen wird. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung werden die Phytostenolester – alleine oder zusammen mit den Potenzierungsmitteln - in an sich bekannter Weise in Gelatine verkapselt, wobei man die Komponenten (a) und gegebenenfalls (b) jeweils in Mengen von 0,1 bis 50, vorzugsweise 1 bis 30, insbesondere 5 bis 25 und besonders bevorzugt 10 bis 15 Gew.-% - bezogen auf das Gewicht der Gelatinekapseln - einsetzt. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Erkenntnis, daß die Verkapselung der Phytostenolester in Gelatine eine vorteilhafte Ausführungsform für die orale Aufnahme der Wirkstoffe darstellt.

Eine weitere Verabreichungsform der Phytostenolester sind Zäpfchen, die rektal oder vaginal eingeführt werden können, und als Suppositoriengrundmasse ebenfalls Gelatine, gegebenenfalls in Kombination mit Glycerin, oder aber synthetische Fette bzw. Wachse, Polyethylenglycole oder natürliche Bestandteile wie z.B. Kakaobutter enthalten können. Daneben ist es möglich, die Phytostenolester in üblichen Nahrungsmitteln zu lösen bzw. zu dispergieren, als da beispielsweise sind : Salatöle, Dressings, Mayonnaisen, Margarinen, Butter, Fritierfette, Kakaoprodukte, Wurst und dergleichen.

M 05.11.99

**Beispiele**Beispiele 1 bis 5, Vergleichsbeispiele V1 bis V3

Es wurden Gelatinekapseln (Gewicht ca. 1,5 g) mit einem Gehalt von 5 Gew.-% verschiedener  $\beta$ -Sitostenolester und gegebenenfalls Vitamin E sowie 0,5 Gew.-% radioaktiv markiertem Cholesterin hergestellt. Zur Untersuchung der hypocholesterinämischen Wirkung ließ man männliche Ratten (Einzelgewicht ca. 200 g) über Nacht fasten. Am folgenden Tag wurde den Versuchstieren jeweils eine zerkleinerte Gelatinekapsel mit etwas kochsalzhaltigem Wasser über eine Magensonde eingeführt. Nach 3, 6, 12, 24 und 48 h wurde den Tieren Blut abgenommen und der Gehalt an radioaktivem Cholesterin bestimmt. Die Ergebnisse, die den Mittelwert der Messungen von 10 Versuchstieren darstellen, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Angaben zur Abnahme der Radioaktivität verstehen sich jeweils in Bezug auf eine Blindgruppe von Versuchstieren, denen lediglich Gelatinekapseln mit einem Gehalt von 20 Gew.-% Vitamin E und einer entsprechenden Menge radioaktiv markiertem Cholesterin verabreicht worden war. Die Mischungen 1 bis 5 sind erfindungsgemäß, die Mischungen V1 bis V3 dienen dem Vergleich.

**Tabelle 1**

**Hypocholesterinämische Wirkung (Mengenangaben als Gew.-% bezogen auf Gelatinekapsel)**

<b>Zusammensetzung/Aktivität</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>V1</b>	<b>V2</b>	<b>V3</b>
Konjuefettsäure- $\beta$ -sitostenolester*	5	-	-	-	-	-	-	-
konj. C <sub>12</sub> -C <sub>24</sub> -Fischfettsäure- $\beta$ -sitostenolester	-	5	-	-	-	-	-	-
Konjuefettsäure- $\beta$ -sitostanolester*	-	-	5	-	-	-	-	-
konj. C <sub>12</sub> -C <sub>24</sub> -Fischfettsäure- $\beta$ -sitostenolester	-	-	-	5	5	-	-	-
Laurinsäure- $\beta$ -sitostanolester	-	-	-	-	-	-	-	-
Ölsäure- $\beta$ -sitostanolester	-	-	-	-	-	5	-	-
Linolsäure- $\beta$ -sitostanolester	-	-	-	-	-	-	5	-
Vitamin E	-	-	-	-	5	-	-	5
<b>Radioaktivität [%-rel]</b>								
- nach 3 h	95	95	95	95	95	95	95	95
- nach 6 h	80	79	78	78	75	84	82	83
- nach 12 h	72	70	68	67	61	76	74	73
- nach 24 h	45	45	43	43	39	51	48	47
- nach 48 h	21	20	18	17	15	30	26	25

\*) Fettsäurebasis: Selin® CLA (Grünau/Illertissen)



M 05.19.98

Patentansprüche

---

1. Verwendung von Estern von Phytosterolen mit Fettsäuren mit 6 bis 24 Kohlenstoffatomen und mindestens 2 konjugierten Doppelbindungen zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln
2. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Ester von  $\beta$ -Sitostenol oder  $\beta$ -Sitostanol einsetzt.
3. Verwendung nach den Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Ester von  $\beta$ -Sitostenol bzw.  $\beta$ -Sitostanol mit konjugierter Linolsäure einsetzt.
4. Verwendung nach den Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Ester von  $\beta$ -Sitostenol bzw.  $\beta$ -Sitostanol mit konjugierter Fischfettsäure einsetzt.
5. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Phytosterolester zusammen mit Potenzierungsmitteln einsetzt, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von Tocopherolen, Chitosanen, Phytosterolestern und (Desoxy)-Ribonucleinsäuren sowie deren Gemischen.
6. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Potenzierungsmittel Vitamin E einsetzt.
7. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Potenzierungsmittel Chitosane mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht im Bereich von 50.000 bis 250.000 bzw. 500.000 bis 2.000.000 Dalton einsetzt.
8. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Potenzierungsmittel marine Desoxyribonucleinsäuren einsetzt, die ein Molekulargewicht im Bereich von 40.000 bis 1.000.000 Dalton aufweisen.
9. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Komponenten (a) und gegebenenfalls (b) in Gelatine verkapselt.
10. Verwendung nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Phytosterolester in Mengen von 0,1 bis 50 Gew.-% - bezogen auf das Gewicht der Gelatine kapseln - einsetzt.

11.05.1198

---

## Verwendung von ausgewählten Phytosterolestern zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln

---

### Zusammenfassung

---

Zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln wird die Verwendung von Phytosterolestern auf Basis konjugierter Fettsäuren vorgeschlagen, die gegenüber den vergleichbaren Produkten des Stands der Technik eine deutlich höhere Aktivität aufweisen. Durch Verkapselung in Gelatine lassen sich die Mittel problemlos auch oral in höheren Dosen verabreichen.